甘藷莖頂組織超低溫冷凍保存之研究

游佩蓁[1]、洪進雄[1]、羅淑芳[2*]

[1]國立嘉義大學園藝學系

[2]行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所農藝系

摘要

本文為國內首次以藻膠包埋玻璃質化法或冷凍鋁片法進行超低溫冷凍保存(cryopreservation)，使甘藷有再生植株形成的研究報告。試驗以甘藷[*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]臺農 57 號、66 號、71 號及 73 號莖頂組織為材料，以藻膠包埋玻璃質化法(encapsulation–vitrification)或冷凍鋁片法(aluminum cryo-plate)進行超低溫冷凍保存，結果顯示臺農 57 號、66 號、71 號及 73 號等 4 個品種，以 MS 基本鹽類培養基添加 0.3 M 蔗糖及 0.9% Difco agar 進行預培養 4 天，可有效提升莖頂組織經 loading solution (LS)溶液及 plant vitrification solution 2 (PVS2) 溶液處理後之組織存活率達 60–100%。以藻膠包埋玻璃質化法配合 LS 溶液 300 min 及 PVS2 溶液 60 min 處理，經液態氮保存後，結果 4 個品種的植株再生率皆為 3.3%，若以 plant vitrification solution 3 (PVS3)替代 PVS2 溶液配合 LS 溶液處理，僅 2 個品種(即臺農 66 號及 71 號)有 3.3%的植株再生率。另外，冷凍鋁片技術以 LS 溶液及 PVS2 溶液皆處理 30 min，經超低溫冷凍處理後結果臺農 66 號的植株再生率達 3.3%，而 LS 溶液處理 30 min 及 PVS2 溶液處理 15 min，使臺農 71 號植株再生率亦為 3.3%。冷凍鋁片技術較藻膠包埋玻璃質化法可節省 45%的處理時間及減少 70%藥品消耗量，此法為頗具潛力的超低溫冷凍保存方法。

關鍵詞：甘藷、超低溫冷凍保存、藻膠包埋玻璃質化法、冷凍鋁片法。

* 通信作者, losf@dns.caes.gov.tw

投稿日期：2012 年 8 月 17 日

接受日期：2012 年 10 月 29 日

作物、環境與生物資訊 9:209-219 (2012)

Crop, Environment & Bioinformatics 9:209-219 (2012)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung 41362, Taiwan ROC

Study on Cryopreservation for Shoot Tip of Sweet Potato

Pei-Chen Yu[1], Chin-Hsiung Hung[1] and Shu-Fang Lo[2*]

[1] Department of Horticulture Science, National Chiayi University, Chiayi 60044, Taiwan ROC

[2] Agronomy Department, Chiayi Branch Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi 60044, Taiwan ROC

ABSTRACT

This is the first report describing the use of encapsulation–vitrification or aluminum cryo-plate technology for cryopreservation of sweet potato and then to regenerate new plants in Taiwan. The shoot tips of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L) Lam.] cultivars Tainung Nos. 57, 66, 71 and 73 were adopted for the experiment. The results showed the survival rate of the shoot tips could increase to 60–100% by pre-culture with MS (Murashige and Skoog) basic salted medium with 0.3 M sucrose and 0.9% Difco agar for 4 d after treatment of loading solution (LS) and plant vitrification solution 2 (PVS2). In the method of encapsulation–vitrification, the shoot tips of four sweet potato cultivars were osmoprotected with LS for 300 min and then dehydrated with PVS2 for 60 min before immersing into liquid nitrogen. The regeneration rate reached 3.3% for all these four cultivars. By replacing PVS2 solution with plant vitrification solution 3 (PVS3) for dehydration and osmoprotection before

immersion into liquid nitrogen, both Tainung No. 66 and No. 71 reached 3.3% regeneration rate. With aluminium cryo-plate technology for cryopreservation, the regeneration rate of Tainung No. 66 reached 3.3% when treated with both LS and PVS2 solutions for 30 min each. Tainung No. 71 had the same rate when treated with 30 min LS and 15 min PVS2. By comparing the results obtained from these two technologies, the cryopreservation using aluminum cryo-plate reduced 45% of processing time and 70% of chemical used. Accordingly, aluminum cryo-plate technology seems a better method for cryopreservation of shoot tips of sweet potato.

Key words: Sweet potato, Cryopreservation, Encapsulation–vitrification, Aluminum cryo-plate.

縮寫表(Acronyms)：

BA	6-Benzyl aminopurine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EG	Ethylene glycol
GA_3	Gibberellic acid 3
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
LN	Liquid nitrogen
LS	Loading solution
MS	Murashige-Skoog medium
NAA	α-Naphthaleneacetic acid
PVS2	Plant vitrification solution 2
PVS3	Plant vitrification solution 3

前言

甘藷[*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]為旋花科(Convoluvlaceae)甘藷屬(*Impomoea*)的植物，營養成分豐富，富含維生素、蛋白質、鈣、鐵及膳食纖維等，有助於維持身體健康(Lai and Cheng 2006)。除了可作為輔助糧食外，因富含澱粉可醱酵後製酒精，亦可加工為罐頭、蜜餞及禽畜飼料，故為一利用性極廣之優良作物。目前甘藷的種原保存方式以現場保存(*in situ* conservation)及體外保存(*in vitro* conservation)的方式為主，但前者容易受外在環境的影響造成種原的流失，後者則因繼代次數的增加而提升突變的機率，造成品種的變異，且此兩種種原保存方式皆須耗費大量的人力、物力及空間維持與運作(Hsu 1995)。然而超低溫冷凍保存技術改善上述的缺點，此方法為將欲保存之植物組織，先經一系列的處理後，再置入液態氮進行保存。因植物組織保存於液態氮中，其生化代謝停止，細胞維持於穩定的狀態而不至於死亡，使植物可長期保存，達到種原長期保存之目的(Yamamoto *et al.* 2012)。至今已超過 160 個物種或栽培種成功地利用超低溫冷凍保存方法保存重要的種原(Yin and Hong 2009, 2010, Sisunandar *et al.* 2010, Hirai and Sakai 2003)；所保存的植物材料相當多樣化，如體胚、不定芽及莖頂等(Popova *et al.* 2010, Burritt 2008, Tasi *et al.* 2009)，可依不同條件需求選擇保存之部位。其中，莖頂組織具非常穩定的基因遺傳特性，且需要保存的空間小，因此為保存植物種原的良好材料。

凡有使用抗凍劑 PVS2 溶液處理之流程者稱為玻璃質化法(vitrification)，其處理步驟為植物組織的預培養(pre-cultured)、滲透保護(osmoprotection)、PVS2 溶液處理、液態氮保存、回溫(rapid warming)、稀釋(dilution)及回復生長等，此處理流程具有操作較簡單、所需工具少且處理時間短，但操作時須甚小心，以免傷害植物組織(Sakai *et al.* 2008, Reed 2008)。而藻膠包埋玻璃質化法由Matsumoto *et al.* (1995)所發表，以玻璃質化法為基礎配合藻膠包埋的處理技術，其處理步驟為植物組織的預培養、藻膠包埋(encapsulation)、滲透保護、PVS2 溶液處理、液態氮保存、回溫、稀釋及回復生長等。此法不需擔心植物組織於操作時的機械傷害，並與玻璃質化法有相同之植物組織存活率，故為另一種良好之處理方法(Sakai *et al.* 2008)。

冷凍鋁片超低溫冷凍保存技術乃由Yamamoto *et al.* 於 2011 年所發表，利用 7 mm × 37 mm × 0.5 mm 的鋁片(Fig. 1)，將植物莖頂組織放置於鋁片上的小孔，先以藻膠

固定後，再經 LS 溶液及 PVS2 溶液處理後，放入冷凍管中即可置入液態氮中保存。此法改善玻璃質化法易傷害植物組織、藻膠包埋玻璃質化法過於冗長的流程，並與玻璃質化法有類似之植物組織存活率，故為一極具潛力的超低溫冷凍保存技術。

進行超低溫冷凍保存技術中，如何有效的降低植物組織的含水量，乃為成功與否的關鍵。以玻璃質化法而言，植物組織經預培養後，先使用LS溶液(標準配方為2 M甘油 + 0.4 M蔗糖，pH 5.8)處理，再進行 PVS2 溶液[標準配方為30% w/v甘油 + 15% w/v乙二醇(ethylene glycol)+15% w/v dimethyl sulfoxide (DMSO) + 0.4 M 蔗糖，pH 5.8)處理，並配合適當的預培養及回復生長培養基，可提升植物組織經液態氮保存後之存活率(Pennycooke and Towill 2000, Sakai *et al.* 1990, Hsu 1995)。而過程中 PVS2 溶液的處理時間極為重要，因 PVS2 溶液可使細胞脫水，降低其細胞水分含量，促進植物組織玻璃質化的形成並減少冰晶的生成，因此於液態氮保存時，可降低細胞受傷的機會，以提升細胞的存活率(Hsu 1995, Benson 2008)。除 PVS2 溶液外尚有 PVS3 溶液可供選用，此溶液為 Nishizawa *et al.* (1993)所發表之抗凍劑，其成分為 50% w/v 甘油及 50% w/v 蔗糖，因不含乙二醇及 DMSO 溶液，故對植物組織的毒性比 PVS2 溶液低(Volk *et al.* 2006)，但目前仍以 PVS2 溶液較為普遍。本研究以甘藷莖頂組織進行超低溫冷凍保存技術之研究，期能開發甘藷種原更長久且經濟的保存方法。

材料與方法

一、供試材料

供試材料為行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所提供之甘藷臺農 57 號(Tainung No.57)、66 號(Tainung No. 66)、71 號(Tainung No. 71)及 73 號(Tainung No. 73)品種的組織培養苗，將培植體切成單節後，置於 MS 基本鹽類培養基(Murashige and Skoog 1962)，添加 30 g L^{-1} 蔗糖及 9.0 g L^{-1} Difco agar, pH5.7 ± 0.1，其培養環境為光照 16 h，溫度 25℃，經 14 d 生長後，切取莖頂進行下列試驗。

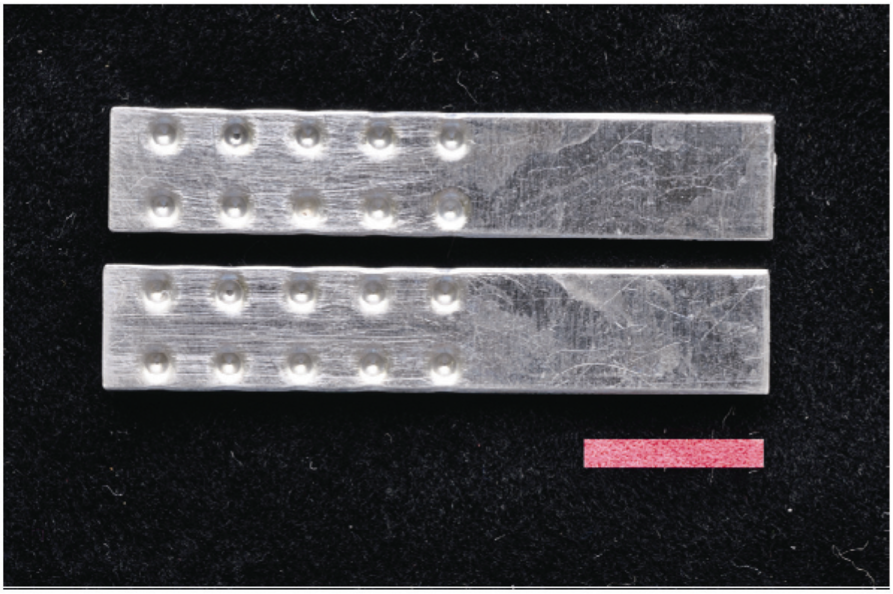

Fig. 1. Aluminum cryo-plates. Bar = 1 cm.

二、莖頂高濃度蔗糖之預培養

將臺農 57 號、66 號、71 號及 73 號品種的莖頂組織切下後，直接移入 MS 基本鹽類及 9.0 g L^{-1} Difco agar，配合 0.0、0.1、0.2、0.3 或 0.4 M 高濃度蔗糖培養 3 d 後，再將莖頂再次切成 2–3 mm 大小，並移入上述不同濃度蔗糖的培養基培養 1 d。將上述預培養的莖頂組織移至冷凍管中，加入 1 mL 的 LS 溶液處理 60 min，將 LS 溶液吸出後，再加入 1 mL 的 PVS2 溶液於冰浴下處理 75 min。將冷凍管中的 PVS2 溶液吸出，並加入 1.2 M 蔗糖 MS 基本培養液進行稀釋處理靜置 20 min，最後將莖頂組織移至含 0.1 mg L^{-1} IAA 的 MS 基本鹽類培養基。於溫度 25℃條件下，先暗培養 7 d 後，再移至每日光照 16 h 下培養 23 d 後，調查其植物組織存活率(其公式＝植株存活數/總培植體數×100%)。

三、藻膠包埋玻璃質化法

將莖頂組織置於藻膠培養液[含 2% (w/v) Na–alginate 及 30 g L^{-1} 蔗糖，不含 Ca^{2+}的 MS 基本培養液]，以滴管將莖頂與藻膠培養液一同滴入包埋培養液，並於 25℃中靜置 30 min。待其形成直徑約 0.5 cm 球形，再將藻膠球培養於含 30 g L^{-1} 蔗糖之 MS 基本鹽類液體培養基，每錐形瓶含有 15 粒藻膠球及 50 mL 培養液，在 90 rpm 震盪速率培養 1 d，再移至含 0.3 M 蔗糖之 MS 基本鹽類液體培養基培養 16 h。將上述處理的藻膠球置於改良 LS 溶液(2 M 甘油+1.6 M 蔗糖，pH 5.8；Hirai and Sakai 2003)，以震盪速率 60 rpm 分別培養 0、60、120、180、240、300 及 360 min，再移至含 PVS2 或 PVS3 溶液(50% w/v 甘油 + 50% w/v 蔗糖，pH 5.8; Nishizawa *et al.* 1993)的錐形瓶，以震盪速率 60 rpm 培養 60 min，每瓶含有 10 粒藻膠球及 20 mL 的 LS 溶液、PVS2 溶液或 PVS3 溶液。將處理後的藻膠球移入含有 1 mL 的 PVS2 溶液或 PVS3 溶液的冷凍管中，並置於液態氮中保存 1 h 後，取出冷凍管直接置入 40℃溫水中回溫 2 min，將冷凍管中的 PVS2 溶液或 PVS3 溶液吸出，再加入含 1.2 M 蔗糖 MS 基本鹽類培養液，靜置 15 min。最後將藻膠球移至含 1 μM α-Naphthaleneacetic acid (NAA), 0.5 μM 6-Benzyl aminopurine (BA), 0.1 μM Kinetin, 30 g L^{-1} 蔗糖及 9.0 g L^{-1} Difco agar 的 MS 基本鹽類培養基，於溫度 25℃條件下，先暗培養 7 d 後，再移至每日光照 16 h 下培養 23 d 後調查其植株再生率(其公式＝植株再生數/總培植體數×100%）。各處理分別以每 10 粒藻膠球為一重複，共重複三次。

四、冷凍鋁片法(aluminum cryo-plate)

切取莖頂(約 1 mm)置於含 0.3 M 蔗糖的 MS 基本鹽類之固體培養基，培養 1 d 後，以微量滴管將藻膠培養液滴至冷凍鋁片上的小孔。再用鑷子將莖頂組織移置冷凍鋁片，每片可放置 10 個莖頂組織，滴入包埋培養液至冷凍鋁片上，於 25℃中靜置 15 min 待其凝固。再置於 LS 溶液處理 30 min 後，移至含 PVS2 溶液分別處理 15、30、45、60、75 或 90 min。將處理後的冷凍鋁片移入冷凍管中，每管 1 片置於液態氮保存 1 h 後，取出冷凍鋁片直接置入含 1.2 M 蔗糖之 MS 基本鹽類培養液，於 25℃中靜置 15 min。將冷凍鋁片上的莖頂組織取下，移至含 1 μM NAA, 0.5 μM BA, 0.1 μM Kinetin, 30 g L^{-1} 蔗糖及 9.0 g L^{-1} Difco agar 的 MS 基本鹽類培養基，於溫度 25℃條件下，先暗培養 7 d 後，再移至每日光照 16 h 下培養 23 d 後調查植株再生率。各處理以每 1 片冷凍鋁片為一重複，共三重複。

五、資料統計與分析

本試驗採完全逢機設計 (complete randomized design; CRD)，處理因子為品種、液態氮及 LS 或 PVS2 的處理時間作 CRD 設計，所獲得的結果資料以無母數分析法 (Factorial Experiment by Kruskal-Wallis Method; Shen 1999)分析，若處理間有達到顯著差異，以 Dunn multiple comparison 檢定法作兩兩比較。

結果

臺農 57 號及 71 號莖頂組織於含 0.3 M 及 0.4 M 蔗糖之 MS 基本鹽類培養基預培養，經 LS 溶液及 PVS2 溶液處理後，其植物組織存活率皆 100%，其次為 0.1 M 蔗糖濃度處理，使植物組織存活率達 90%。臺農 66 號莖頂組織於含 0.2–0.4M 蔗糖之 MS 基本鹽類培養基預培養，經 LS 溶液及 PVS2 溶液處理後，其植物組織存活率皆 100 %，其次為 0.1 M 蔗糖濃度處理，使植物組織存活率達 90%。臺農 73 號莖頂組織，於含 0.2 M 蔗糖的 MS 基本培養基預培養後，經 LS 溶液及 PVS2 溶液處理後，其植物組織存活率達 90%，其次為 0.1 M 及 0.3M 蔗糖濃度處理，使植物組織存活率達 60% (Table 1)。綜合以上結果得知，MS 基本培養基中添加 0.3 M 蔗糖濃度作為預培養，經 LS 溶液及 PVS2 溶液處理後，可有效提升甘藷莖頂組織之存活率。

以藻膠包埋玻璃質化法及 PVS2 溶液保存甘藷莖頂組織，臺農 57 號以 LS 溶液處理 300 min 及 PVS2 溶液處理 60 min，經液態氮保存後，結果於回復培養基第 30 d 均無植株再生，需經培養 75 d 後才有植株再生(Fig. 2A)，臺農 66 號、71 號及 73 號以 LS 溶液處理 300 min 及 PVS2 溶液處理 60 min，於回復培養基第 30 d 其植株再生率皆為 3.3% (Table 2)，再繼續培養至 45 天植株生長的情形(Figs. 2B、2C 及 2D)。未經液態氮保存處理中，結果顯示 PVS2 溶液處理 60 min 配合 LS 溶液不同的處理時間，對於植株的再生效果，品種之間有顯著的差異，以臺農 57 號及臺農 66 號效果較佳，其次為臺農 71 號，而臺農 73 號的植株再生的效果最差；另外 LS 溶液不同的處理時間對於植株的再生無顯著的效果；並且品種與 LS 不同的處理時間並沒有顯著的交感效應(Table 3 及 Table 4)。

以藻膠包埋玻璃質化法及 PVS3 溶液保存甘藷莖頂組織，經液態氮保存處理中，結果顯示臺農 66 號及 71 號分別以 LS 溶液處理 300 min 及 360 min 後，再以 PVS3 溶液處理 60 min，植株再生率皆為 3.3%。而臺農 57 號及 73 號以 LS 溶液處理 0–360 min 及 PVS3 溶液處理 60 min，均無任何再生植株產生(Table 5)。未經液態氮保存處理中，品種之間、LS 溶液不同處理時間對於植株的再生無顯著的效果，而品種與 LS 不同的處理時間並沒有顯著的交感效應(Table 6)。

甘藷臺農 57 號、66 號、71 號及 73 號等 4 個不同品種的莖頂組織，於含有 0.3M 蔗糖的 MS 基本鹽類培養基預培養 1d 後，再將莖頂以藻膠包埋冷凍鋁片法處理，結果顯示臺農 66 號以 LS 溶液處理 30 min 及 PVS2 溶液處理 30 min，經液態氮處理後，回復培養之植株再生率為 3.3%；而臺農 71 號以 LS 溶液

Table 1. Effect of different sucrose concentrations in pre-culture on the survival rates of *Ipomoea batatas* (L) Lam. cultivars Tainung Nos. 57, 66 and 71 without cryopreservation[z].

Sucrose concentration (M)	Survival rate (%)[y]			
	TNG 57	TNG 66	TNG 71	TNG 73
0.0	30	50	40	0
0.1	90	90	90	60
0.2	80	100	80	90
0.3	100	100	100	60
0.4	100	100	100	20

[z] Recovery medium: Full strength MS basal medium with 0.1 mg L^{-1} IAA, 30 g L^{-1} sucrose and 9.0 g L^{-1} Difco agar. Data were collected after 30 days of culture.

[y] Survival rate (%). Shoot tips pre-cultured on full strength MS basal medium with 0.3M sucrose and 9.0 g L^{-1} Difco agar, then loaded with LS for 60 min and dehydrated with PVS2 for 75 min at 0℃. Approximately 10 shoot tips were tested for each cultivar.

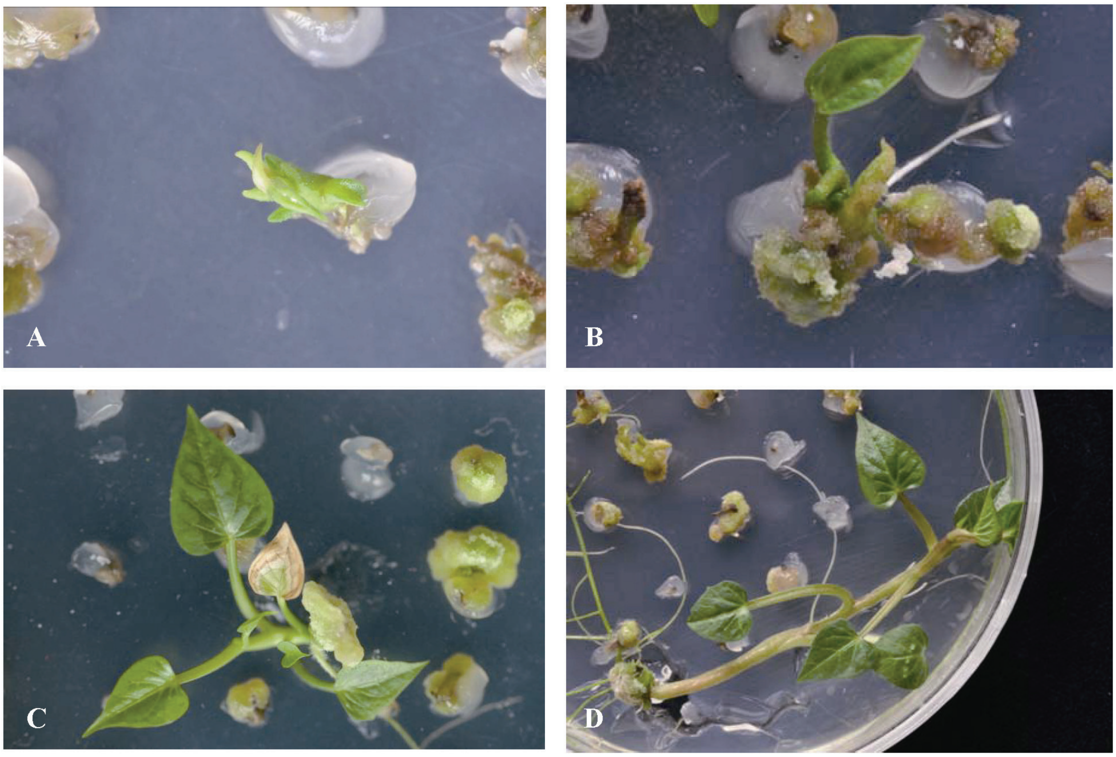

Fig. 2. Plant regeneration of sweet potato cultivars after cryopreservation by encapsulation–vitrification. A. Tainung No. 57 shoot tip after cryopreservation for 75 days; B. Tainung No. 66 shoot tip after cryopreservation for 45 days; C. Tainung No. 71 shoot tip after cryopreservation for 45 days; D. Tainung No. 73 shoot tip after cryopreservation for 45 days.

Table 2. Effect of different times for LS treatment with PVS2 on the plant regeneration rate of shoot tips of *Ipomoea batatas* (L) Lam. cultivars Tainung Nos. 57, 66, 71 and 73 with / without cryopreservation by encapsulation–vitrification[z].

LS treatment (min)	Plant regeneration rate (%)							
	Cultivar							
	TNG 57		TNG 66		TNG 71		TNG 73	
	-LN[y]	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN
0	23.3	0	6.7	0	20.0	0	0	0
60	26.7	0	3.3	0	3.3	0	0	0
120	13.3	0	0	0	0	0	0	0
180	3.3	0	6.7	0	0	0	0	0
240	6.7	0	13.3	0	0	0	0	0
300	0	0	6.7	3.3	0	3.3	0	3.3
360	0	0	13.3	0	0	3.3	0	0

[z] Recovery medium: Full strength MS basal medium with 1.0 μM NAA, 0.5 μM BA 0.1μM kinetin, 30 g L^{-1} sucrose and 9.0 g L^{-1} Difco agar. Data were collected after 30 days of culture.

[y] Shoot tips pre-cultured on full strength MS basal medium with 0.3 M sucrose and 9.0 g L^{-1} Difco agar, then loaded with different times for LS and dehydrated with PVS2 for 60 min without (-LN) / with (+LN) immersion into liquid nitrogen. Approximately 10 shoot tips were tested for each of three replicates.

Table 3. The result table of Factorial Experiment by Kruskal-Wallis Method (Shen 1997) for effect of different times for LS treatment with PVS2 on the plant regeneration rate of shoot tips of *Ipomoea batatas* (L) Lam. cultivars Tainung Nos. 57, 66, 71 and 73 without cryopreservation.

Source	DF	Sum of square	Chi-square statistic	*P*-Value
Variety	3	7892.81	13.27	0.004**
Time	6	2465.79	4.14	0.657
Variety x Time	18	8609.57	14.47	0.698

**Significant at 1% level.

Table 4. Varietal comparisons among effects of LS treatment with PVS2 on the plant regeneration rate of shoot tips of *Ipomoea batatas* (L.) Lam without cryopreservation.

Variety	TN57	TN66	TN71	TN73
Regeneration Rate (%)	10.5 ± 3.3 a*	7.1 ±2.0 ab	3.3 ± 2.4 bc	0 ± 0 c

* Mean ± standard error (n = 21). Means followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by the Dunn multiple comparison test.

Table 5. Effects of different times for LS treatment with PVS3 on the plant regeneration rates of shoot tips of *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cultivars Tainung Nos. 57, 66, 71 and 73 with / without cryopreservation by encapsulation–vitrification[z].

LS treatment (min)	Plant regeneration rate (%)							
	Cultivar							
	TNG 57		TNG 66		TNG 71		TNG 73	
	-LN[y]	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN
0	0	0	26.7	0	16.7	0	0	0
60	0	0	16.7	0	3.3	0	0	0
120	0	0	6.7	0	0	0	0	0
180	0	0	0	0	0	0	3.3	0
240	0	0	3.3	0	6.7	0	0	0
300	0	0	6.7	3.3	3.3	0	0	0
360	0	0	0	0	6.7	3.3	0	0

[z] Recovery medium: Full strength MS basal medium with 1.0 μM NAA, 0.5 μM BA 0.1 μM Kinetin, 30 g L^{-1} sucrose and 9.0 g L^{-1} Difco agar. Data were collected after 30days of culture.

[y] Shoot tips pre-cultured on full strength MS basal medium with 0.3 M sucrose and 9.4 g L^{-1} Difco agar, then loaded with different times for LS and dehydrated with PVS3 for 60 min without (-LN) / with (+LN) immersion into liquid nitrogen. Approximately 10 shoot tips were tested for each of three replicates.

Table 6. The result table of Factorial Experiment by Kruskal-Wallis Method (Shen 1997) for effects of different times for LS treatment with PVS3 on the plant regeneration rate of shoot tips of *Ipomoea batatas* (L) Lam. cultivars Tainung Nos. 57, 66, 71 and 73 without cryopreservation.

Source	D F	Sum of square	Chi-square statistic	*P*-Value
Variety	3	4360.14	7.33	0.062
Time	6	1496.08	2.51	0.867
Variety x Time	18	4638.11	7.80	0.982

處理 30 min 及 PVS2 溶液處理 15 min，植株再生率亦為 3.3%，而臺農 57 號及 73 號則無任何植株再生(Table 7)。未經液態氮保存處理中，品種之間、PVS2 溶液不同處理時間對於植株的再生沒有顯著的差異，而品種與 PVS2 不同的處理時間並沒有顯著的交感效應(Table 8)；Fig. 3 為臺農 66 號及 71 號利用冷凍鋁片法經超低溫冷凍保存後於回復生長培養基培養 45 天的植株生長情形。

討論

目前已有許多物種可藉由高濃度蔗糖的預培養提升植物組織的存活率，如山葵以 0.3 M 蔗糖培養基預培養 1 d，可有效提升莖頂組織經液態氮保存後之存活率(Matsumoto *et al.* 1995)。Halmagyi and Deliu (2007)指出康乃馨因不同品種需使用 0.5 M 或 0.75 M 蔗糖培養基預培養 1 d；鐵皮石斛以 0.75 M 蔗糖培養基預培養 5 d (Yin and Hong 2009)，其植物組織經液態氮保存後有最佳之存活率，故最適當之預培養蔗糖濃度及培養天數依不同植物物種調整。Hirai and Sakai (2003)及 Pennycooke and Towill (2000)指出甘藷莖頂組織於含 0.3 M 蔗糖的 MS 基本鹽類培養基進行預培養，可有效提升莖頂組織經超低溫冷凍保存後之組織存活率。本研究同樣地發現 0.3 M 蔗糖濃度為預培養的蔗糖濃度，可提高植物組織的存活率。

Tsai (2004)及 Yang (2002)指出甘藷臺農 25 號及甘藷臺農 69 號以 LS 溶液及 PVS2 溶液進行玻璃質化法經超低溫冷凍保存後，有再生植株形成。Yin and Hong (2009)指出鐵皮石斛亦可藉由 LS 溶液及 PVS2 溶液處理進行超低溫冷凍保存。本研究同樣以藻膠包埋

Table 7. Effect of PVS2 with different times of LS treatment on the plant regeneration rates of shoot tips of *Ipomoea batatas* (L) Lam. cultivars Tainung Nos. 57, 66, 71 and 73 with / without cryopreservation by aluminum cryo-plates[z].

PVS2 treatment (min)	Plant regeneration rate (%)							
	Cultivar							
	TNG 57		TNG 66		TNG 71		TNG 73	
	-LN[y]	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN
15	0	0	10.0	0	13.3	3.3	3.3	0
30	0	0	6.7	3.3	3.3	0	0	0
45	0	0	3.3	0	6.7	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	6.7	0
75	0	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0	0

[z] Recovery medium: Full strength MS basal medium with 1.0 μM NAA, 0.5 μM BA 0.1 μM Kinetin, 30 g L^{-1} sucrose and 9.0 g L^{-1} Difco agar. Data was collected after 30days of culture.

[y] Shoot tips pre-cultured on full strength MS basal medium with 0.3 M sucrose and 9.0 g L^{-1} Difco agar, then loaded with different times of LS for 30 min without (-LN) / with (+LN) immersion into liquid nitrogen. Approximately 10 shoot tips were tested for each of three replicates.

Table 8. The result table of Factorial Experiment by Kruskal-Wallis Method (Shen 1997) for effects of PVS2 with different times of LS treatment on the plant regeneration rates of shoot tips of *Ipomoea batatas* (L.) Lam. cultivars Tainung Nos. 57, 66, 71 and 73 without cryopreservation.

Source	D F	Sum of square	Chi-square statistic	*P*-Value
Variety	3	1036.33	2.37	0.500
Time	6	2020.17	4.61	0.594
Variety x Time	18	2128.17	4.86	0.999

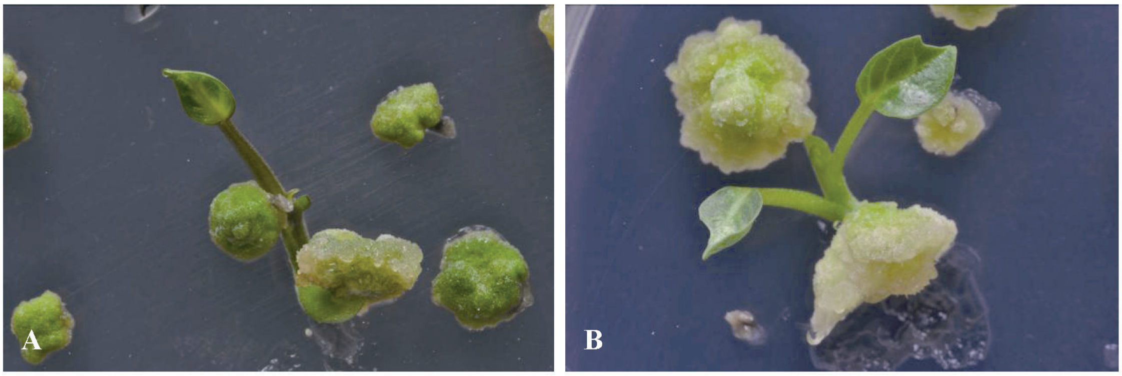

Fig. 3. Plant regeneration of sweet potato cultivars after cryopreservation by aluminum cryo-plates. A. Tainung No. 66 shoot tip after cryopreservation for 45 days; B. Tainung No. 71 shoot tip after cryopreservation for 45 days.

玻璃質化法及 PVS2 溶液保存甘藷莖頂組織，4 個不同品種皆有 3.3%之植株之再生。由此可知，超低溫冷凍保存中，LS 溶液及 PVS2 溶液處理對於植株存活率的重要性。此外，除以 PVS2 溶液進行植物組織超低溫冷凍保存技術外，亦可使用 PVS3 溶液處理椰子及芒果等(Sajini *et al.* 2011, Wu *et al.* 2003)。本研究以 PVS3 溶液代替 PVS2 溶液，可使臺農 66 號及臺農 71 號莖頂組織，經液態氮保存後亦有 3.3%之植株再生，顯示 PVS3 溶液處理亦可使甘藷莖頂組織經液態氮保存後不致死亡。綜合以上結果可知，4 個甘藷品種以 PVS2 溶液處理皆有植株再生，而以 PVS3 溶液處理僅臺農 66 號及 71 號有植株再生，因此 PVS2 溶液較 PVS3 溶液適合作為甘藷超低溫冷凍保存技術的冷凍保護劑。類似的結果如 Garcia *et al.* (2011)，其研究指出三角葉西番蓮以 PVS2 溶液處理經液態氮保存後之植株再生率高於 PVS3 溶液處理；而康乃馨處理 PVS2 溶液或 PVS3 溶液且經液態氮保存後，其植株再生率則無明顯的差異(Sekizawa *et al.* 2011)，故不同物種對不同種類之抗凍劑的適用性不同。本研究認為植株再生率低的原因，可能為甘藷本身屬於熱帶物種，較不耐低溫處理。此外，切取甘藷莖頂組織進行超低溫冷凍處理過程中，莖頂組織嚴重受損，導致癒合組織形成及植株再生率偏低，且未經 LS 溶液、PVS2 溶液或 PVS3 溶液處理及液態氮保存的莖頂組織仍有癒合組織的形成，顯示回復生長培養基中植物生長調節劑的種類及濃度，可能較不適合甘藷臺農 57 號、66 號、71 號及 73 號莖頂組織的再生。回復生長培養基成分的重要性，如康乃馨於含 0.1 mg L^{-1} IAA 培養基，可有效促進根系的分化，進而再形成完整植株(Halmagyi and Deliu 2007)。甘藷於含 2.2 μM BA 及 0.49 μM Indole-3-butyric acid (IBA)且不含 NH_4NO_3 的 MS 基本培養基，有最佳之植株再生率(Pennycooke and Towill 2001)。Hirai and Sakai (2003)指出含 0.5 mg L^{-1} BA 或 1.0 mg L^{-1} Gibberellin (GA)的 MS 基本鹽類培養基，進行 2 階段式的回復生長培養，其植株再生率可達 80%，但以臺農 66 號進行相同處理流程，則無任何植株再生(data not shown)。由此可知，回復生長培養基成分不僅須依不同物種進行調整，也必須依不同品種加以改良。

選擇不同的超低溫冷凍保存處理流程，使 LS 溶液及 PVS2 溶液最適當的處理時間亦有差異，如臺農 66 號及臺農 71 號莖頂組織以藻膠包埋玻璃質化法經液態氮保存後，最適當處理時間為 LS 溶液處理 300 min 及

PVS2 處理 60 min，有植株再生的情形。若以冷凍鋁片法進行液態氮保存處理，以 LS 溶液處理 30 min 及 PVS2 處理 15–30 min，亦有植株再生，故最佳處理時間及最佳植物組織存活率會因處理流程不同而有所影響。Matsumoto *et al.* (1998)亦指出星辰花莖頂組織以玻璃質化法進行超低溫冷凍保存，其最適當之處理時間為 LS 溶液 30 min 及 PVS2 溶液 15 min 有最高之存活率，而以藻膠包埋玻璃質化法進行超低溫冷凍保存，其最適當之處理時間為 LS 溶液 30 min 及 PVS2 溶液 50 min 有最高之存活率，故 LS 溶液及 PVS2 溶液最佳處理時間需因不同超低溫冷凍保存的方法而有所調整。因此，進一步探討液態氮保存前之處理流程，以提升甘藷組織的抗凍性，並於超低溫冷凍保存過程中盡可能降低機械性傷害，以及調整回復生長培養基之植物生長調節劑的種類及濃度，應可提升甘藷莖頂組織之植株再生率。

藻膠包埋玻璃質化法及冷凍鋁片法操作流程所需的時間、藥品量、植株再生率之比較顯示，藻膠包玻璃質化法進行全部流程需 48 h，藥品量為 277 mL，而冷凍鋁片法僅需 26.5 h，藥品量為 83.5 mL。因此冷凍鋁片法較藻膠包埋玻璃質化法節省 45%的時間及減少 70%的藥品量；因冷凍鋁片法包埋於莖頂組織外的藻膠量少於藻膠包埋玻璃質化法，故 LS 溶液及 PVS2 溶液能更快速的產生作用，因此可減少處理時間及藥品量。然而植株再生率方面，藻膠包埋玻璃質化較法冷凍鋁片法使較多的品種有再生植株的產生，但冷凍鋁片法較藻膠包埋玻璃質操作上更簡便、快速，並且可應用於多種物種之莖頂組織(Sekizawa *et al.* 2011, Yamamoto *et al.* 2011)，故冷凍鋁片法具有發展潛力。

本研究結果顯示甘藷可藉由超低溫冷凍保存技術保存種原，以藻膠包埋玻璃質化法或冷凍鋁片法皆可獲得再生植株，其中以冷凍鋁片法為最新的超低溫冷凍保存法，且操作上更加簡單快速，故極具發展潛力。

誌謝

本研究承行政院農業委員會科技計畫經費支援(100 農科-8.1.1.1-農-C1)，並承農業試驗所呂助理研究員椿棠、楊助理研究員滿霞及農業試驗所嘉義分所廖助理研究員大經協助資料分析，謹此一併誌謝。

引用文獻

Benson EE (2008) Cryopreservation Theory. p.26-28. *In*: Plant Cryopreservation: A practical guide. BM Reed (ed.) Springer, New York.

Burritt DJ (2008) Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x erythrophylla* using encapsulation–dehydration requires pretreatment with both ABA and proline. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 95:209–215.

Garcia RO, G Pacheco, MG Vianna, E Mansur (2011) *In vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L.: slow growth and cryopreservation. **Cryo-letters** 32:377–388.

Halmagyi A, C Deliu (2007) Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips by encapsulation–vitrification. **Sci. Hort.** 113: 300–306.

Hirai D, A Sakai (2003) Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions for osmoprotection. **Plant Cell Rep.** 21:961–966.

Lai YC, YX Cheng (2006) A variety of sweet potato varieties and processed products. (in Chinese) **Agric. Exp. Tech. Serv.** 68:35.

Matsumoto T, C Takahashi, A Sakai, Y Nako (1998) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. **Sci. Hort.** 76:105–114.

Matsumoto T, A Sakai, C Takahashi, K Yamada (1995) Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation–vitrification method. **Cryo-letters** 16:189–196.

Murashige T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant** 15:473–497.

Nishizawa S, A Sakai, Y Amano, T Matsuzawa

(1993) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryonic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Sci.** 91:67–73.

Pennycooke JC, LE Towill (2000) Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. **Plant Cell Rep.** 19:733-737.

Pennycooke, JC, LE Towill (2001) Medium alternations improve regrowth of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] shoot tips cryo-preserved by vitrification and encapsulation-dehydration. **Cryo-letters** 22: 381–389

Popova E, HH Kima, KY Paek (2010) Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) somatic embryos using sucrose preculture and air desiccation. **Sci. Hort.** 124: 522–528.

Reed BM (2008) Cryopreservation – practical considerations. p.10. *In*: Plant Cryopreservation: A Practical Guide. BM Reed (ed.) Springer, New York.

Sajini KK, A Karun, CH Amamath, F Engelmann (2011) Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos by vitrification. **Cryo–letters** 32:317–328.

Sakai A, D. Hirai, T. Niino (2008) Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. p.35–36. *In*: Plant Cryopreservation: A Practical Guide. BM Reed (ed.) Springer, New York.

Sakai A, S Kobayashi, I Oiyama (1990) Cryo-preservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Rep.** 9:30–33.

Sekizawa K, S Yamamoto, T Rafique, K Fukui, T Niino (2011) Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. **Plant Bio.** 28:401–405.

Shen ML (1997) Practical Nonparametric Statistics and Count Data Analysis. (in Chinese) p.241–246. Jiu Zhou Press, Taiwan.

Shii CT (1995) Crop germplasm *in vitro*. (in Chinese) **Special Publ. Taiwan Agric. Res. Inst.** 55:69–80.

Sisunandar, A Rival, P Turquay, Y Samosir, SW Adkins (2010) Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes in recovered seedlings. **Planta** 232: 435–447.

Tsai SF, SD Yeh, CF Chan, SI Liaw (2009) High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of transgenic papaya lines. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 98:157–164.

Tsai SF (2004) Investigation of pretreatments protocol on the cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] treated by vitrification. (in Chinese with English abstract) Master Thesis. Department of Life Sciences, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 78 pp.

Wu YJ, XL Huang, JN Xiao, XJ Li, MD Zhou, F Engelmann (2003) Cryopreservation of mango (*Mangifera indica* L.) embryogenic cultures. **Cryo-letters** 24:303–314.

Yamamoto S, K Fukui, T Niino (2012) Cryostorage facilitation by the NIAS genebenk. p.75-90. *In*: Plant Genetic Resources for Food and Agriculture in Asia and the Pacific: Impacts and Future Directions. NISA. Japan.

Yamamoto S, T Rafique, WS Priyantha, K Fukui,T Matsumoto, T Niino (2011) Development of a cryopreservation procedure using aluminum cryo-plates. **Cryo–letters** 32:256–265.

Yang CY (2002) Cryopreservation of Tainung 69 sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]. (in Chinese with English abstract) Master Thesis. Department of Life Sciences, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan. 55 pp.

Yin MH, SR Hong (2009) Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 98:179–185.

Yin MH, SR Hong (2010) A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 101: 349–358.